

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780188

研究課題名（和文） ニジマス細菌感染症（連鎖球菌）に対する抵抗性関連遺伝子領域の特定

 研究課題名（英文） Identification of disease resistance loci against bacterial disease (*Streptococcus iniae*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

研究代表者 尾崎 照遵 (OZAKI AKIYUKI)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・養殖技術部・育種研究グループ（主任研究員）

研究者番号：40416045

## 研究成果の概要（和文）：

今回の網羅的発現遺伝子解析の情報と連鎖解析による位置的候補遺伝子座の情報との情報共有研究で、ニジマス細菌感染症（連鎖球菌）に対する抵抗性遺伝子領域の領域は、有意差が見られるマーカー座位の存在する領域は、特に新規に候補になる遺伝子連鎖群ではなかったが、MHC class II、及び MHC class Ib などの免疫関連遺伝子の存在する領域や、それらがゲノム重複した領域の複数個所に概ね一致した。特に連鎖群 RT-3、RT-16、RT-2、RT-29、RT-27、RT-31、RT-17、RT-22 が連鎖球菌症抗病性に関する重要な領域である可能性が高いと考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Streptococcal disease (streptococcosis) caused by *Streptococcus iniae* is a serious bacterial disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Developing streptococcosis-resistant rainbow trout will reduce the number of outbreaks of this disease as well as reduce the need for medicines and vaccines. Genetic linkage analysis is an effective method for identifying quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to a disease. In this study, microsatellite markers selected from genetic linkage maps of rainbow trout and BC<sub>1</sub> progeny from crosses between disease-resistant and disease-susceptible parents were used for detection of QTL associated with resistance to this disease. The immune-related genes on the same linkage group are correlated with significant QTL about disease resistance. Especially some studies have reported that QTLs are located on the same linkage group with the MHC class I, II or toll-like receptor regions. Linkage groups on QTL region were specifically targeted in these studies because they carry the classical MHC class I and II genes previously linked to differences in susceptibility to viral, bacterial, and parasitic diseases. Some loci associated with disease resistance were found in the RT-3, RT-16, RT-2, RT-29, RT-27, RT-31, RT-17 and RT-22 linkage groups. These QTL regions are candidates for disease resistance against streptococcal infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円

2011年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2012年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
年度			
年度			
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：キーワード：(1) ニジマス (2) 連鎖球菌症 (3) 連鎖解析 (4) QTL (5) 発現プロファイル (6) 抗病性育種

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題の対象であるニジマスの連鎖球菌による魚病被害は、発病サイズが数10gからキロサイズまでと育成期間の長期にわたり被害を与えるため、被害額が大きく抜本的解決策がない。このため、国内外で慢性的被害を与え続け、細菌感染症のなかでは長年の懸案事項となっている。本研究では遺伝育種による連鎖球菌症の抗病性系統の作出を目標に、ニジマスの連鎖球菌症に対する抵抗性遺伝子座領域の特定を目的とする。

### 研究背景-1

遺伝育種において従来の表現型のみに基づく選抜育種方法は、有用形質（経済形質）を固定するのに長期間を必要とする。形質の遺伝的固定を系統内交配により行うため、継代交配を重ねれば近交弱勢が起り、固定した品種を安定維持することが困難となる。これらの問題を解決するために、有用形質を識別可能にするDNAマーカーを探索するQTL解析と、そのDNAマーカーを用いることで、天然・養殖集団から有用形質を持つ個体を選抜でき、有用形質を担う遺伝子座のみを固定することが可能となる。このため水産養殖対象種において国内外でQTL解析研究が進められている（業績1, 8, 14. 参考文献1, 2, 3.）、またニジマスIPN抗病性についてのマーカー選抜育種法の成功例をはじめとする（業績7, 19.）、水産養殖対象種において国内外で抗病性のQTL解析や選抜育種の報告例が増えてきているものの、表現型として明確に有用形質を示す系統の不足から、抗病性のQTL解析の報告例は多くはない。またニジマスにおいては、ウイルス病抵抗性遺伝子座と寄生虫病抵抗性遺伝子座の報告例はあるものの（参考文献1, 2.）、細菌感染症の抵抗性遺伝子座の報告はない。またこれまでの抗病性QTL解析の実例から、抗病性に関連する遺伝子座領域は、病原体に関わらず、同じ領域が候補領域となることが示唆されている。そのゲノム領域には、免疫応答に関与する遺伝子群が存在

することも明らかになっていることから（業績1, 参考文献1, 2, 3.）、ウイルス、細菌、原虫、寄生虫などのさまざまな病原体と、抗病性に関与する遺伝子座との関係を明らかにしていく研究が求められている。一方で、水産養殖の生産現場では実用的系統の作出が求められているものの、その実現には様々な病原体に抵抗性を示す優良形質の重複化を行なうことが必要であり、総合的に抗病性を持つ品種を作成するマーカー選抜育種（Marker-Assisted Selection）及びマーカー浸透交雑（Marker-Assisted Introgression）を利用して表現形質を付加させるオーダーメイド育種（Tailor made genetic breeding）を実践する上でも、いろいろな形質についてもQTL解析の実例と、関与する遺伝子座の特定を積み上げていく必要性がある。

### 研究背景-2

長野県水産試験場および養殖研究所では、連鎖球菌症に対する感受性の異なるクローンニジマスの系統、連鎖球菌症抗病性系統（C25）および連鎖球菌症感受性系統（AA4）と両系統の雑種第一代F<sub>1</sub>を保持している。材料として用いるクローンニジマスは、長年の感染実験から、連鎖解析に重要な要素である表現形質の遺伝性も証明されており、系統のクローン性は遺伝子発現解析に用いる際の、解析材料としても申し分のない条件を備えているという特色を有する。

また連鎖解析に必要なDNAマーカーもニジマスでは、900座位以上の遺伝子連鎖地図が出来ており、ゲノム全体に渡った遺伝解析が可能である。なおかつサケ科魚類では、3000種類以上の発現遺伝子情報をのせたDNAマイクロアレイが作製されており網羅的発現プ

ロファイル解析が可能である。これら研究の遂行を行なう上で必要な研究材料と研究ツールとが揃っている状態にあり、実行さえできれば成果が得られる可能性が非常に高い。

## 2. 研究の目的

水産養殖において病気による被害はきわめて甚大であるが、水を介した開放系の飼育条件下で病原体の伝播を食い止める有効な手段は、現段階ではワクチン接種以外にないと言える。このため、育種によって養殖対象種に対して抗病性を付与できれば、コスト的にも手間の面でも有効な手段となり得る。近年、次世代の育種法として有用形質（経済形質）を識別可能にする量的遺伝子座解析（Quantitative Trait Loci : QTL 解析）や、それを利用した選抜育種法としてのマーカー選抜育種法が注目を浴びており、養殖対象種の抗病性品種の開発が強く望まれている。本研究では細菌感染症に対する抵抗性遺伝子座領域の特定とそれを利用した抗病性育種を目的にしている。

## 3. 研究の方法

ゲノムワイドな連鎖解析による位置的候補遺伝子座の探索により、表現型データとの相関を解析することにより、位置的候補遺伝子座を特定する。さらにはDNAマイクロアレイを用いた発現プロファイルによる網羅的発現遺伝子解析に病原体感染による候補遺伝子を特定する、異なる手法を用いた双方からなる結果、連鎖解析による位置的候補遺伝子座の情報と網羅的発現遺伝子解析の情報からなる信頼性の高い抗病性形質関連遺伝子及び領域の特定が可能となる。

### (1) 連鎖解析による位置的候補遺伝子座の探索

既知の最新版ニジマス遺伝子連鎖地図の中から、全ゲノム領域をカバーできるようにDNAマーカーを選別し、感染実験より得た死亡個体、生存個体において、マーカー座位における遺伝型データを収集し、表現型データとの相関を解析することにより、位置的候補遺伝子座を特定する。

### (2) 発現プロファイルによる網羅的発現遺

## 伝子解析

血液および胸腺からRNAサンプルを取り解析、網羅的に遺伝子をプロットされたDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを行い、両系統の発現遺伝子の違いを比較することにより、病原体感染による候補遺伝子を特定する。

(3) 連鎖解析と発現プロファイルの結果からの抵抗性関連遺伝子領域の特定  
連鎖球菌による細菌感染の表現型データと連鎖解析による位置候補遺伝子座と、抗病性系統、および連鎖球菌症感受性系統の系統間の違いによる発現遺伝子の網羅解析の結果を検討し、細菌感染症に関する抗病性関連遺伝子とその領域を特定する。

## 4. 研究成果

### (1) 連鎖解析による位置的候補遺伝子座の探索

感染実験により得たBC1の個体に対して、DNA多型が検出可能かを確認したマイクロサテライトマーカーを用いて、マーカー座位における遺伝型データを収集し、表現型（生存、死亡）と経過日数ごとによる表現型データとDNA多型による遺伝型の連鎖関係を、LINKFMEX、Map Manager QTX、MapQTLなどの複数の遺伝解析ソフトウェアを用いて遺伝統計学的に解析する。この抗病性形質の表現型データとの相関を解析することにより、位置的候補遺伝子座を複数個所特定した。

### (2) DNAマイクロアレイによる網羅的発現遺伝子解析

連鎖球菌症抗病性系統（C25）および連鎖球菌症感受性系統（AA4）を用いて連鎖球菌による感染実験を行い、死亡が始まる4日まで経時的（6、12、24、48、72時間）に実験魚をサンプリングした。血液および胸腺からRNAサンプルを取り解析、網羅的に遺伝子をプロットされたDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを行い、両系統の発現遺伝子の傾向の違いを比較することにより、病原体感染に関与する候補遺伝子を特定した、特に連鎖球菌症抗病性にはMHC class II、及びMHC class Ibが、領域、及び発現遺伝子ともに抗病性に関与することが示唆された。

(3) 網羅的発現遺伝子解析の情報と連鎖解析による位置的候補遺伝子座の情報との融合

網羅的発現遺伝子解析の結果を受け、それら発現候補遺伝子の位置情報を検索、細菌感染表現型データと連鎖解析による位置候補遺伝子座の結果の情報を融合し、信頼性の高い細菌感染症に関する抗病性関連遺伝子とその領域を特定した。網羅的に遺伝子をプロットされたDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを行い、両系統の発現遺伝子の傾向の違いを比較することにより、病原体感染に関与する候補遺伝子を特定し、連鎖解析による位置候補遺伝子座の結果の情報を融合し、信頼性の高い細菌感染症に関する抗病性関連遺伝子とその領域を特定した。今回の連鎖解析で、有意差が見られるマーカー座位の存在する領域は、MHC class II、及びMHC class Ibなどの免疫関連遺伝子の存在する領域や、それらがゲノム重複した領域の複数個所に概ね一致した。特に連鎖群 RT-3、RT-16、RT-2、RT-29、RT-27、RT-31、RT-17、RT-22 が連鎖球菌症抗病性に関する重要な領域である可能性が高いと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) 尾崎 照遵, 観賞魚育種と水産育種研究, 水産育種, 査読有, 42/2. 2013, 63~70
- (2) 尾崎 照遵他, 完全養殖時代におけるゲノム情報の水産育種への応用, 水産育種, 査読有, 41. 2012, 173~178
- (3) 尾崎 照遵, 完全養殖時代における QTL 情報を利用した水産育種の現状と未来, 第 17 回動物遺伝育種シンポジウム Proceedings, 査読無, 17. 2011, 43~53
- (4) Akiyuki Ozaki et al. Progress of DNA Marker-Assisted Breeding In Maricultured Finfish. Bulletin of Fisheries Research Agency. 査読有, 35. 2011, 31~37
- (5) Akiyuki Ozaki, Hiroyuki Okamoto, Toshiyuki Yamada, Tomomasa Matuyama, Takamitsu Sakai, Kanako Fuji, Takashi Sakamoto, Nobuaki Okamoto, Kazunori Yoshida, Keita Hatori, Kazuo Araki, Masanori Okauchi, Linkage analysis of resistance to *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Aquaculture, 査読有, 308. 2010, 62~67

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 尾崎 照遵, 完全養殖時代における QTL 情報を利用した水産育種の現状と未来, 第 17 回動物遺伝育種シンポジウム, 2011 年

11月20日, 広島 大学

- (2) 尾崎 照遵他, 完全養殖時代におけるゲノム情報の水産育種への応用, 水産学会平成 23 年度秋期大会, 2011 年 9 月 28 日, 長崎 大学
- (3) Ozaki A. et.al. PROGRESS OF DNA MARKER-ASSISTED BREEDING IN MARICULTURE FINFISH, UJNR Aquaculture Panel The 39th Scientific Symposium, 2010-10-26, 鹿児島大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
尾崎 照遵 (OZAKI AKIYUKI)  
独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・養殖技術部・育種研究グループ  
(主任研究員)  
研究者番号: 40416045

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: